

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE VOLÁTILES DE *Physalis philadelphica* LAM.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Physalis philadelphica* LAM. VOLATILES

Humberta G. Calyecac-Cortero<sup>1</sup>, Juan Cibrián-Tovar<sup>2</sup>, Marcos Soto-Hernández<sup>3</sup> y Rómulo García-Velasco<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. 42660. Tepatepec, Hidalgo. (hcalyecac@yahoo.com). <sup>2</sup>Entomología y Acarología, <sup>3</sup>Botánica, Campus Montecillo Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>4</sup>Centro Universitario UAEM Tenancingo. Universidad Autónoma del Estado de México. Ex Hacienda de Santa Ana. 52400. Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. Tenancingo, Estado de México.

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los componentes volátiles del tomate de cáscara *Physalis philadelphica* Lam. Por lavado con hexano, aireación dinámica (AD) y micro extracción en fase sólida (MEFS) se aislaron volátiles de *P. philadelphica*, los cuales se analizaron e identificaron por cromatografía de gases (CG) y CG acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los compuestos recolectados por AD y MEFS se identificaron como salicilato de metilo,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -pineno, alcohol bencílico, 3-careno,  $\beta$ -elemeno, decanal y germacreno D. Los componentes recolectados lavando las plantas con hexano fueron  $\beta$ -cariofileno, linolenato de etilo, salicilato de metilo,  $\beta$ -pineno, ácido hexadecanoico, linolenato de metilo, alcohol bencílico, germacreno D, 3-careno,  $\beta$ -elemeno y decanal.

**Palabras clave:** Aireación dinámica, aleloquímicos, CG, CG-EM, micro extracción en fase sólida, tomate de cáscara.

### INTRODUCCIÓN

México es el centro de origen y domesticación del tomate de cáscara *Physalis ixocarpa* Brot. sinónimo de *P. philadelphica* Lam. En 2004, la superficie sembrada con este cultivo en México fue 60 518.38 ha, con una producción cercana a 723 000 t y un valor de producción de \$2 506 091 478 pesos. Actualmente se cultiva en 28 Estados y los principales productores son Sinaloa con 18 624.53 ha, Jalisco con 6865 y Puebla con 5226 (SIACON, 2005). El tomate de cáscara se emplea en la preparación de platillos, sopas, ensaladas y en la industria para la elaboración de salsas. Desde la década de los ochenta se exporta a los EE.UU. (Pérez y Granados, 2001) como producto fresco y elaborado consumido principalmente por

### ABSTRACT

This study was conducted to isolate and identify the volatile components of husk tomato *Physalis philadelphica* Lam. Volatiles were collected by washing with hexane and through dynamic aeration (DA) and solid phase micro-extraction (SPME). The volatiles collected were isolated, analyzed and identified with gas chromatography (GC) coupled with mass spectrometry (GC-MS). The final compounds collected by DA and SPME were identified as methyl salicylate,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -elemene, decanal and germacrene D. The compounds collected by hexane washing were  $\beta$ -caryophyllene, ethyl linolenate, methyl salicylate,  $\beta$ -pinene, hexadecanoic acid, methyl linolenate, benzyl alcohol, D germacrene, 3 carene,  $\beta$ -elemene and decanal.

**Key words:** Dynamic aeration, allelochemicals, GC, GC-MS, solid phase micro-extraction, husk tomato.

### INTRODUCTION

México is the center of origin and domestication of the husk tomato *Physalis ixocarpa* Brot., synonym of *P. philadelphica* Lam. In 2004 the area cultivated under this crop in México was 60 518.38 ha, producing nearly 723 000 t and valued at \$2 506 091 478 pesos. At present, it is cultivated in 28 States and the main producers are Sinaloa with 18 624.53 ha, Jalisco with 6 865 and Puebla with 5226 (SIACON, 2005). Husk tomatoes are used in the preparation of main dishes, soups and salads, and are industrialized for the production of sauces. Since the 1980s, it is exported to the US (Pérez and Granados, 2001) fresh and processed, consumed mainly by the population of Mexican origin. Besides México, it is cultivated in Guatemala, Colombia (Bukasov, 1963), Poland, Russia (Bock *et al.*, 1995), the US, Australia, Israel (Peña and Márquez, 1990), Jamaica, Kenya, Puerto Rico, Rajasthan, Trinidad and Tobago, and Taiwan (Morton, 1987).

Recibido: Enero, 2006. Aprobado: Noviembre, 2006.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 337-346. 2007.

la población de origen mexicano. Además de México, se cultiva en Guatemala, Colombia (Bukasov, 1963), Polonia, Rusia (Bock *et al.*, 1995), EE.UU., Australia, Israel (Peña y Márquez, 1990), Jamaica, Kenia, Puerto Rico, Rajastan, Trinidad y Tobago y Taiwan (Morton, 1987).

Cientos de aleloquímicos volátiles son liberados por las plantas; su presencia y concentración en algunos grupos puede ser una característica diferencial (Smith, 1976). Los componentes volátiles de las plantas comúnmente incluyen alcoholes de cadena corta, aldehídos, ésteres, compuestos aromáticos, mono y sesquiterpenos (Bernays y Chapman, 1994). Los volátiles verdes son una serie de alcoholes y aldehídos de hasta seis átomos de carbono ampliamente distribuidos en las plantas de diversos grupos (Fuentes-Contreras *et al.*, 2001). La respuesta que los volátiles provocan en los herbívoros puede ser de repulsión, atracción o pueden actuar como atrayentes de sus enemigos naturales (Thaler *et al.*, 2002).

Hay herbívoros con un conjunto de hospederos limitado a plantas de un solo género, como *Heliothis subflexa* (Gn.) (Lepidoptera: Noctuidae) que es consumidor especialista del género *Physalis* (Brazzel *et al.*, 1953) y una plaga importante del tomate de cáscara (Hernández y Carrillo, 1973). Tingle *et al.* (1990) reportaron una alta preferencia de este insecto a los extractos volátiles, no identificados, de *P. angulata*. También hay insectos que se alimentan de una sola especie, como el picudo del tomate de cáscara *Trichobaris championi* Barber (Coleoptera: Curculionidae), plaga de *P. philadelphica* (Bautista y Morales, 2000). Los volátiles liberados por esta planta atraen a *T. championi* (Calyecac-Cortero *et al.*, 2006); al caracterizar los constituyentes volátiles de la planta de tomate de cáscara se puede utilizar esta información para entender el comportamiento (por ejemplo de atracción a la planta) de los insectos plaga de este cultivo. Por tanto, el objetivo de este estudio fue aislar e identificar los componentes volátiles de *P. philadelphica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plantas de *Physalis philadelphica*

En los invernaderos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, se sembró tomate de cáscara de una variedad Criolla, en charolas de 100 cavidades, a un fotoperíodo de 14:10 h luz: oscuridad. Diez días después de la emergencia se trasplantaron en macetas plásticas de 40 cm de altura y 42 cm de diámetro. El aislamiento de los volátiles se realizó con plantas de 10 a 25 d después del trasplante (ddt), con 17 a 28 cm de altura.

Hundreds of allelochemical volatiles are released by the plants, and their presence and concentration in some groups may be a differentiating characteristic (Smith, 1976). Volatile components of plants commonly include short-chain alcohols, aldehydes, esters, aromatic compounds, mono- and sesquiterpenes (Bernays and Chapman, 1994). Found widely distributed among different groups of plants, green volatiles are a series of alcohols and aldehydes of up to six carbon atoms (Fuentes-Contreras *et al.*, 2001). The response that the volatiles provoke in herbivores may be repellence, attraction, or even attraction of their natural enemies (Thaler *et al.*, 2002).

There are herbivores with a range of host plants limited to a single genus, such as *Heliothis subflexa* (Gn.) (Lepidoptera: Noctuidae), which is a specialized consumer of the *Physalis* genus (Brazzel *et al.*, 1953) and a major pest of husk tomatoes (Hernández and Carrillo, 1973). Tingle *et al.* (1990) reported that this insect had high preference for unidentified volatile extracts of *P. angulata*. There are also insects that feed on a single species, such as the husk tomato weevil *Trichobaris championi* Barber (Coleoptera: Curculionidae), pest of *P. philadelphica* (Bautista and Morales, 2000). The volatiles released by this plant attract *T. championi* (Calyecac-Cortero *et al.*, 2006). By characterizing the volatile constituents of the husk tomato plant, it would be possible to use this information to understand the behavior of pest insects of this crop (for example, their attraction to a plant). Thus, the objective of this study was to isolate and identify the volatile components of *P. philadelphica*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Physalis philadelphica* plants

A local variety of husk tomato was sown in 100-hole trays in the greenhouses at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. The photoperiod was 14:10 h light:darkness. Ten days after emergence, they were transplanted to plastic pots 40 cm high and 42 cm diameter. Isolation of the volatiles was performed with 17 to 28 cm tall plants 10 to 25 d after transplanting (dat).

### Collection of volatiles

#### Dynamic aeration (AD)

Twenty-four plants with the roots covered with aluminum foil were placed in a gas cleansing jar (22 cm high, 13 cm internal diameter, 2.5 L capacity). The jar was covered with a glass cover (13 cm in diameter), with a 3 cm diameter opening in the center and ground-down neck in which was inserted a ground-down stopper with two glass tubes. A hose (Tygon-B-44-4X) was connected to

## Recolección de volátiles

### Aireación dinámica (AD)

Se colocaron 24 plantas con las raíces cubiertas con papel aluminio en un frasco para limpieza de gases (22 cm altura, 13 cm diámetro interno, 2.5 L capacidad). El frasco se cubrió con una tapa de cristal (13 cm diámetro), con una abertura central de 3 cm de diámetro y cuello esmerilado, en la cual se insertó un tapón esmerilado con dos tubos de cristal. En cada tubo se adaptó una manguera (Tygon-B-44-4X); la primera se conectó a una bomba de aire (Elite 801) y en esta manguera se insertó una trampa de tubo de vidrio (10 mm longitud, 5 mm diámetro interno, 7 mm diámetro externo) empacado con 100 mg de carbón activado de malla 20/40 (Supelco) entre dos tapones de fibra de vidrio grado plaguicida (Supelco), y esta trampa sirvió para limpiar el aire que entró al sistema. La segunda manguera funcionó como salida del aire donde se insertó una trampa empacada con 50 mg de adsorbente Super-Q<sup>®</sup> malla 80/100 (Alltech), para capturar los volátiles del tomate de cáscara (Figura 1).

La trampa con carbón activado fue acondicionada durante 12 h a 250 °C, en un horno Blue M. La trampa con Super-Q<sup>®</sup> fue acondicionada con 10 mL de metanol, 10 mL de acetona y 10 mL de hexano grado HPLC Merck, y se secó con nitrógeno grado cromatográfico. El flujo de salida fue 100 mL min<sup>-1</sup> y se midió con un flujómetro manual Hewlett Packard. La captura de los volátiles se realizó durante 48 h a 23±2 °C. Los volátiles fueron eluidos de la trampa en viales ámbar de 2 mL, en dirección al flujo de aire, con 2 mL de hexano grado HPLC (Merck), y el extracto se concentró a 100 µL con corriente suave de nitrógeno grado cromatográfico.

### Lavado con hexano

Se colocaron 24 plantas de *P. philadelphica* desprovistas de raíz, en un matraz de 1 L. Se adicionaron 100 mL de hexano grado HPLC, cubriendo completamente las plantas con el solvente y se

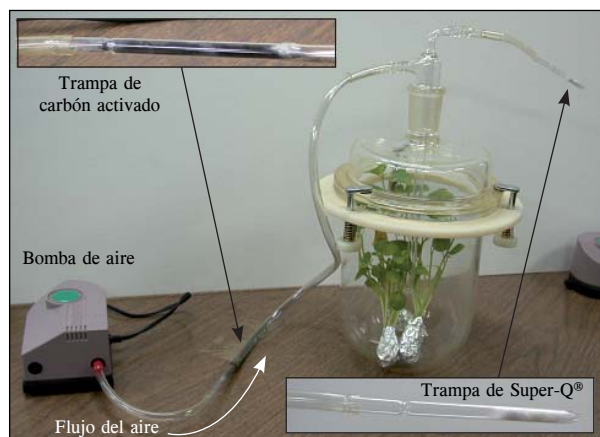


Figura 1. Dispositivo para la captura de volátiles de *Physalis philadelphica* por aireación dinámica.

Figure 1. Device for the capture of volatiles from *Physalis philadelphica* by dynamic aeration.

each tube: the first was connected to an air pump (Elite 801) and a glass-tube trap (10 mm long, 5 mm internal diameter, 7 mm external diameter) packed with 100 mg activated carbon screen 20/40 (Supelco) was inserted between two pesticide grade fiber glass stoppers. This trap served to clean the air that entered the system. The second hose functioned as the air exit where a trap packed with 50 mg of Super-Q<sup>®</sup> adsorbent 80/100 mesh (Alltech) to capture the husk tomato volatiles (Figure 1).

The trap with activated carbon was conditioned for 12 h at 250 °C in a Blue M oven. The Super-Q<sup>®</sup> trap was conditioned with 10 mL methanol, 10 mL acetone and 10 mL of HPLC grade Merck hexane and dried with chromatographic grade nitrogen. Exit flow was 100 mL min<sup>-1</sup>, measured with a manual Hewlett Packard flow meter. Volatiles were captured for 48 h at 23±2 °C. The volatiles were eluted from the traps into 2-mL amber vials in the direction of air flow, with 2 mL HPLC grade hexane (Merck). The extract was concentrated to 100 µL with a soft current of chromatographic grade nitrogen.

### Hexane washing

Twenty-four rootless *P. philadelphica* plants were placed in a 1 L flask to which 100 mL of HPLC grade hexane was added, completely covering the plants; the flask was shaken for 10 min in a horizontal shaker. After 0.5 h, the hexane was recovered in 10 mL amber vials, and the content of each vial was concentrated to 100 µL with a soft current of chromatographic grade nitrogen.

### Solid phase micro-extraction (SPME)

Volatiles were captured with the SPME system (Figure 2) using fiber covered with 100 µm of polydimethylcyclohexane (Supelco<sup>®</sup>). Twenty-four husk tomato plants were placed in a gas cleansing recipient, similar to that used in the DA system. The second ground-down entrance of the recipient was covered first with a layer of aluminum foil and later with two layers of parafilm. After 24 h, the SPME fiber was inserted into the recipient through the layers of aluminum foil and parafilm and exposed for 1 h.

### Identification of volatiles

The extracts and the fiber containing the *P. philadelphica* volatiles were analyzed by gas chromatography (GC) and GC coupled with a mass spectrometer (GC-MS). The gas chromatograph was a 5890 model equipped with a manual injection system, a split-splitless injector and flame ionization detector (FID), with nitrogen as the carrier gas, and a stationary phase (polyethyleneglycol) Supelcowax-10 capillary column (30 m long, 0.32 mm internal diameter and 0.25 µm thick). Initial temperature of the oven was 50 °C for 1 min, and later this was increased 5 °C min<sup>-1</sup> up to 200 °C, maintaining this temperature for 20 min; the temperature of the detector was 280 °C.

A gas chromatograph was used coupled with a Hewlett Packard (HP) 6890 mass spectrometer equipped with a manual

agitó el matraz durante 10 min en un agitador horizontal. Después de 0.5 h, se recuperó el hexano en viales ámbar de 10 mL, y el contenido de cada vial se concentró a 100  $\mu\text{L}$  con corriente suave de nitrógeno grado cromatográfico.

### Micro extracción en fase sólida (MEFS)

Los volátiles fueron capturados con el sistema MEFS (Figura 2) usando una fibra recubierta con 100  $\mu\text{m}$  de polidimetilsiloxano (Supelco®). Se colocaron 24 plantas de tomate de cáscara en un frasco para limpieza de gases similar al usado en el sistema de AD. La segunda entrada esmerilada del frasco se cubrió primero con una capa de papel aluminio y luego con dos capas de parafilm. Después de 24 h se insertó la fibra de MEFS en el frasco a través de las capas de papel aluminio y parafilm y se expuso durante 1 h.

### Identificación de volátiles

Los extractos y la fibra conteniendo los volátiles de *P. philadelphica* se analizaron por cromatografía de gases (CG) y CG acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El cromatógrafo de gases fue un modelo 5890 equipado con sistema de inyección manual, inyector split-splitless y detector de ionización de flama (FID), con nitrógeno como gas acarreador y columna capilar Supelcowax-10 (30 m longitud, 0.32 mm diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  espesor) de fase estacionaria (polietilenglicol). La temperatura inicial del horno fue de 50  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min, se aumentó 1  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta alcanzar 70  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 min, luego se aumentó 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta 150  $^{\circ}\text{C}$  que se mantuvo 2 min, y luego un aumento de 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta 200  $^{\circ}\text{C}$  manteniéndose por 20 min; la temperatura del detector fue 280  $^{\circ}\text{C}$ .

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard (HP) 6890 con un sistema de inyección manual, inyector split-splitless y detector de masa (HP 5973 MSD) en modo impacto electrónico. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  del extracto, usando el modo de inyección splitless y la temperatura del inyector fue 250  $^{\circ}\text{C}$ . Se usó una columna capilar HP-5MS (30 m longitud, 0.25 mm diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  espesor) de fase estacionaria (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano). La columna se mantuvo a flujo constante de 2  $\text{mL min}^{-1}$  utilizando helio como gas acarreador. Los espectros de masa fueron registrados a 70 eV en modo escanear de 50 a 500 amu (unidades de masa atómica por sus siglas en inglés). Las condiciones de trabajo fueron similares a las usadas en el CG. Para la captura con MEFS, inmediatamente después de retiradas del sistema de captura, se insertaron las fibras individualmente en el puerto de inyección del CG y del CG-EM, usando las condiciones descritas.



Figura 2. Sistema de micro extracción en fase sólida (MEFS).  
Figure 2. System of solid phase micro-extraction (MEFS).

injection system, split-splitless injector and mass detector (HP 5973 MSD) in electronic impact mode. One  $\mu\text{L}$  of the extract was injected using the splitless injection mode and the temperature of the injector was 250  $^{\circ}\text{C}$ . A HP-5MS stationary phase (5% phenyl, 95% dimethylpolysiloxane) capillary column (30 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.25  $\mu\text{m}$  thick) was used. The column kept a constant flow of 2  $\text{mL min}^{-1}$  using helium as carrier gas. The mass spectrums were recorded at 70 eV in scan mode of 50 to 500 amu (atomic mass units). Working conditions were similar to those used in GC. For capture with SPME, immediately after withdrawing the capture system, fibers were inserted individually in the injection port of the GC and GC-MS under the conditions described.

To identify the compounds, the NIST 98 (National Institute of Standard and Technology) library (Stein *et al.*, 2000) was used, and those compounds which had spectrums with more than a 50% similarity were taken into account. The following commercial standards (Aldrich®) were injected into two capillary columns with different polarities:  $\beta$ -pinene, 3-carene, benzyl alcohol, decanal, methyl salicylate,  $\beta$ -caryophyllene, hexadecanoic acid, methyl linolenate, and ethyl linolenate. The spiking technique was also used (a small quantity of standard was added to the extract; this was injected and the increase of the area under the compound curve was compared) to confirm that they were the same compounds. Kovats retention indexes (K.I.) were also calculated. To this end, a mixture of linear alkanes (octane up to triacontane, except for heptacosane and nanocosane) under identical work conditions. The following equation for programmed temperatures was used (Bartle, 1993; Robards *et al.*, 1994):

$$I(x) = 100TR(x) - TR(Z)/TR(Z+1) - TR(Z) + 100Z$$

where  $I(x)$ : retention index of compound  $x$ ;  $TR(x)$ : elution temperature of compound  $x$ ;  $TR(Z)$ : elution temperature of the alkane before compound  $x$ ;  $TR(Z+1)$ : elution temperature of the alkane after compound  $x$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

Comparing the chromatograms of the volatile components from *P. philadelphica* plants (10 to 25 dat) obtained through extraction by hexane washing, DA and SPME, quantitative and qualitative differences are observed (Figure 3). With the hexane washing extraction method, 13 major, well-defined peaks occur as well as numerous undefined minor peaks (Figure 3a). These peaks correspond to materials found in small quantities which are highly similar to hexane (Weurman, 1969). The use of solvents plus shaking for compound extraction is very common, but the disadvantage is that a large quantity of compounds that interfere in the identification of the major components are also extracted (Millar and Haynes, 1998).



Para identificar los compuestos se empleó la biblioteca NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, por sus siglas en inglés) (Stein *et al.*, 2000), tomando en cuenta aquellos compuestos cuya similitud de espectros fue mayor a 50%. Se realizó la inyección de los estándares comerciales (Aldrich®):  $\beta$ -pineno, 3-careno, alcohol bencílico, decanal, salicilato de metilo,  $\beta$ -cariofileno, ácido hexadecanoico, linolenato de metilo y linolenato de etilo, en dos columnas capilares con distinta polaridad, además de la técnica del spiking (se adicionó una pequeña cantidad del estándar al extracto, se inyectó y cotejó el incremento del área bajo la curva del compuesto) para corroborar que se trataba de los mismos compuestos. También se calcularon los índices de retención de Kovats (I.K.), para lo cual se inyectó una mezcla de alcanos lineales (octano hasta triacotano, excepto heptacosano y nanocosano) bajo condiciones de trabajo idénticas, y se empleó la siguiente ecuación para temperaturas programadas (Bartle, 1993; Robards *et al.*, 1994):

$$I(x) = 100TR(x) - TR(Z)/TR(Z+1) - TR(Z) + 100Z$$

donde  $I(x)$ : índice de retención del compuesto  $x$ ;  $TR(x)$ : temperatura de elución del compuesto  $x$ ;  $TR(Z)$ : temperatura de elución del alcano anterior al compuesto  $x$ ;  $TR(Z+1)$ : temperatura de elución del alcano posterior al compuesto  $x$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparando los cromatogramas correspondientes a los componentes volátiles de plantas de *P. philadelphica* (10 a 25 ddt), obtenidos mediante extracción de lavado con hexano, AD y MEFS, se observaron diferencias cuantitativas y cualitativas (Figura 3). Con el método de extracción de lavado con hexano se presentaron 13 picos mayores y bien definidos, además de numerosos de picos minoritarios no definidos (Figura 3a); estos picos corresponden a materiales en pequeñas cantidades y muy afines al hexano (Weurman, 1969). El uso de solventes más la agitación de la muestra para la extracción de compuestos es muy común, pero la desventaja es que se extrae una gran cantidad de compuestos que interfieren en la identificación de los componentes mayoritarios (Millar y Haynes, 1998).

En el caso de AD, el cromatograma (Figura 3b) presentó ocho picos mayoritarios; con el método de lavado con hexano hubo picos no definidos que corresponden a compuestos minoritarios u obtenidos durante el lavado del cartucho donde se capturaron los volátiles (Stevens, 1998).

En el cromatograma correspondiente a MEFS (Figura 3c) ocurrieron ocho picos mayoritarios y no hubo picos minoritarios y debido a esta característica este sistema es muy recomendable para trabajos cualitativos de alta precisión (Penton, 1996). Además se

In the case of DA the chromatogram (Figure 3b) had eight major peaks; with the method of hexane washing there were non definite peaks that correspond to compounds minority or obtained when washing the cartridge where volatiles were captured (Stevens, 1998).

The chromatogram corresponding to SPME (Figure 3c) had eight major peaks and there were no small peaks; this is the reason that this system is highly recommended for high precision qualitative studies (Penton, 1996). Moreover, the use of solvents during sample processing is avoided (Pawliszyn, 1997), and once the conditions of work are determined, the analysis can be performed in a short time (Schulz *et al.*, 2000).

When relative abundance of the *P. philadelphica* volatiles obtained by the three methods is compared (Figure 3), it can be observed that with the hexane washing method a larger number of volatiles are extracted. With SPME, a lower number of compounds were obtained and those obtained were relatively less abundant, but with well-defined peaks in the chromatogram (Penton, 1996).

With the DA and SPME methods, the profiles of the volatiles obtained were qualitatively equal and quantitatively very similar. The most abundant components were methyl salicylate,  $\beta$ -caryophyllene and  $\beta$ -pinene, with a relative abundance of 10 to 48%. The rest of the volatiles were less than 2% in relative abundance: 3-carene, benzyl alcohol,  $\beta$ -elemene, decanal and germacrene D (Table 1).

Thus, with the extraction methods from complete plants, without removing the root (DA and SPME), lower quantities of compounds were obtained, in contrast with the hexane washing method in which the root was removed and the aerial part submerged in the solvent. In this respect, Dicke *et al.* (1990) mention that when a plant is cut and macerated, changes in the composition and proportion of volatiles take place.

In the extracts obtained by washing plants with hexane, 13 volatile compounds were detected in husk tomato (Figure 3a, Table 1), of which 11 were identified as  $\beta$ -pinene, 3-carene, benzyl alcohol,  $\beta$ -elemene, decanal, methyl salicylate,  $\beta$ -caryophyllene, germacrene D, hexadecanoic acid, methyl linolenate, and ethyl linolenate, plus two non identified compounds with less than 15% spectrum similarity respect to those of the NIST 98 library. The most abundant compounds were methyl salicylate,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -pinene and ethyl linolenate; the first three of these were obtained also with DA and SPME, although in different quantities. The relative abundance of the components extracted in greater proportion by hexane washing was between 14 and 35%; the rest of the volatiles

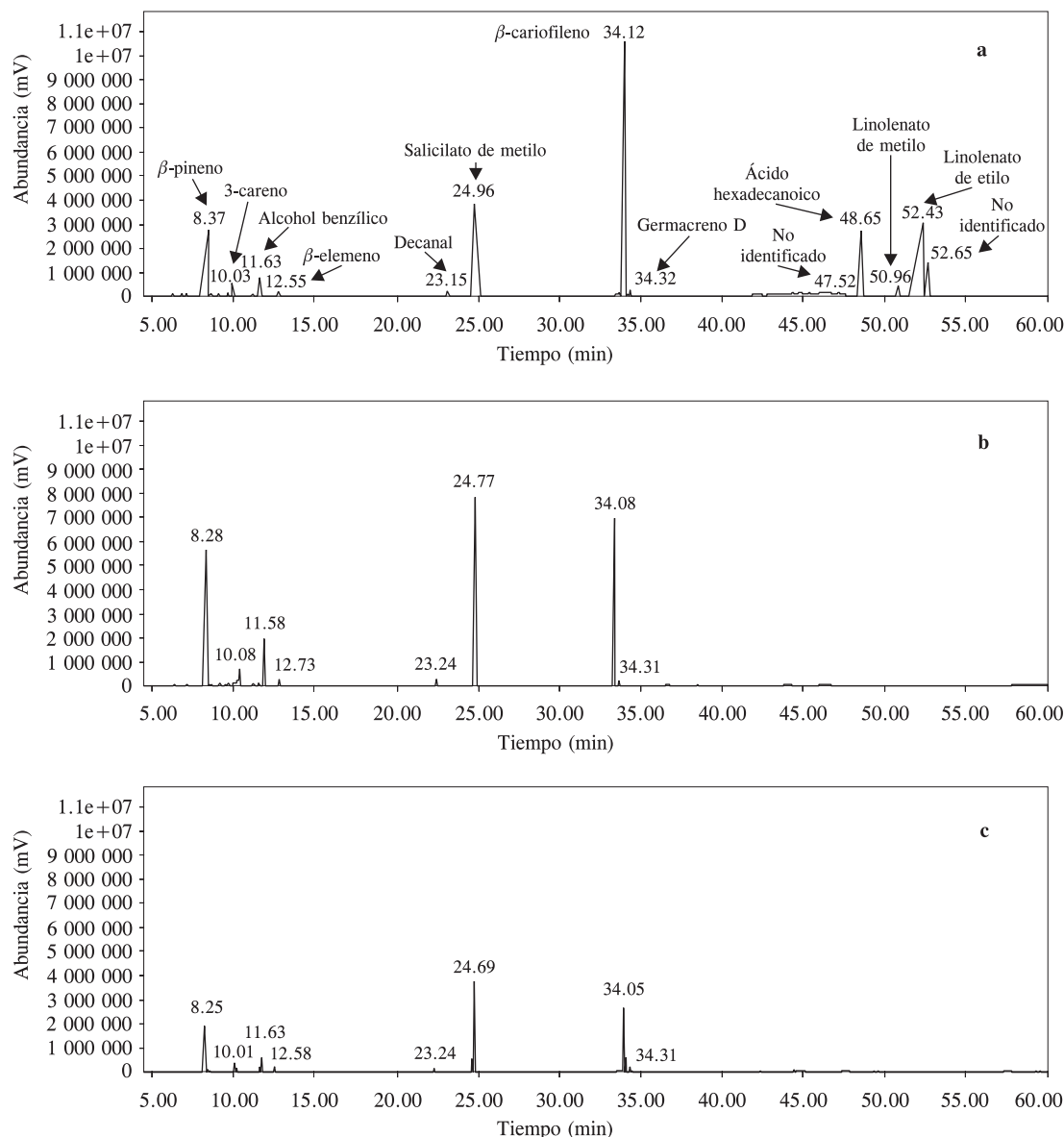


Figura 3. Cromatogramas de volátiles de *P. philadelphica* usando tres métodos de extracción a) lavado con hexano, b) AD y c) MEFS.

Figure 3. Chromatograms of *P. philadelphica* volatiles using three methods of extraction: a) hexane washing, b) DA and c) SPME.

evita el uso de disolventes durante el procesamiento de las muestras (Pawliszyn, 1997) y una vez determinadas las condiciones de trabajo el análisis se realiza en poco tiempo (Schulz *et al.*, 2000).

Al comparar la abundancia relativa de los volátiles de *P. philadelphica* obtenidos por los tres métodos utilizados (Figura 3), se aprecia que con el método de lavado con hexano se extrajo un número mayor de volátiles. Con MEFS se obtuvo menor número de compuestos, menor abundancia relativa de cada compuesto, pero con picos bien definidos en el cromatograma (Penton, 1996).

were below 5% in relative abundance: 3 carene, benzyl alcohol,  $\beta$ -elemene, decanal and germacrene D extracted also by DA and SPME. Hexadecanoic acid and methyl linolenate were also detected; but not in extracts obtained by other methods (Table 1).

Release of  $\beta$ -caryophyllene and germacrene D (Table 1) increased in the extracts obtained by hexane washing, where the root was removed and only the aerial part of the plant was manipulated. Buttery *et al.* (1987) worked with *Lycopersicon esculentum* and observed that in intact leaves the concentration of (Z)-3-hexanal and (E)-2-hexanal was relatively low.

Con los métodos de AD y MEFS, los perfiles de los volátiles obtenidos fueron iguales cualitativamente y muy similares cuantitativamente. Los componentes mayoritarios fueron: salicilato de metilo,  $\beta$ -cariofileno y  $\beta$ -pineno, con abundancia relativa de 10 a 48%; los demás volátiles fueron menores a 2% de abundancia relativa: 3-careno, alcohol bencílico,  $\beta$ -elemeno, decanal y germacreno D (Cuadro 1).

Así, con los métodos de extracción donde se mantuvo la planta completa, sin retirar la raíz (AD y MEFS), se obtuvo una menor cantidad de compuestos, a diferencia del método de lavado con hexano en el cual se cortó la raíz de la planta y la parte aérea se sumergió en un solvente. Al respecto, Dicke *et al.* (1990) mencionan que cuando un vegetal se corta y macera, se producen cambios en la composición y proporción de volátiles.

En los extractos obtenidos mediante lavado de plantas con hexano se detectaron 13 compuestos volátiles del tomate de cáscara (Figura 3a, Cuadro 1), de los cuales 11 se identificaron como:  $\beta$ -pineno, 3-careno, alcohol bencílico,  $\beta$ -elemeno, decanal, salicilato de metilo,  $\beta$ -cariofileno, germacreno D, ácido hexadecanoico, linolenato de metilo y linolenato de etilo; además de dos compuestos no identificados cuya similitud de espectros con respecto a los de la biblioteca NIST 98 fueron menores de 15%. Los componentes mayoritarios fueron salicilato de metilo,  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -pineno y linolenato de etilo; los tres primeros se obtuvieron también con AD y MEFS, aunque en diferente cantidad. La abundancia relativa de los componentes mayoritarios por el método de lavado estuvo entre 14 y 35%; los demás volátiles fueron menores a 5% de abundancia relativa: 3-careno, alcohol bencílico,  $\beta$ -elemeno, decanal y germacreno D extraídos

In cut leaves, however, the concentration of these aldehydes increased drastically. In a study with potato plants (*Solanum tuberosum*), intact leaves released small quantities of  $\beta$ -caryophyllene, and when small cuts were made in the leaves,  $\beta$ -caryophyllene was released in greater quantity and germacrene was also released (Angelopolus *et al.*, 1999).

In the extracts obtained by hexane washing, hexadecanoic, methyl linolenate and ethyl linolenate were found; these were not detected in extracts obtained with DA and SPME with which the entire plant was used without removing the root. This phenomenon was observed in a study conducted with tomato plants (*L. esculentum*) with lesions. A higher number of volatile compounds were found in plants with lesions than in plants without (Thaler *et al.*, 2002).

Eight of the husk tomato plant volatiles have been found in nine species of solanaceas. Methyl salicylate is found in *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *L. esculentum* (Buttery *et al.*, (1987), *Capsicum annum* (Baur *et al.*, 1996), *Datura wrightii* (Fraser *et al.*, 2003), *Nicotiana silvestris*, *N. suaveolens* (Loughrin *et al.*, 1992), and *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002). Benzyl alcohol is found in *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987), *C. annum* (Baur *et al.*, 1996), *Datura wrightii* (Fraser *et al.*, 2003), *N. silvestris* and *N. suaveolens* (Loughrin *et al.*, 1992). Decanal is found in *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987), *C. annum* (Baur *et al.*, 1996) and *D. wrightii* (Fraser *et al.*, 2003).  $\beta$ -pinene is found in *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987), *S. stuckertii*, and *S. incisum* (Zygadio and Grosso, 1997).  $\beta$ -caryophyllene is in *S. tuberosum* (Dickens, 2000); *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987) and *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002). Germacrene D is in *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002) and *S.*

**Cuadro 1. Índices de Kovats y promedio de proporción relativa de los volátiles de tomate de cáscara colectados mediante tres métodos.**  
Table 1. Kovats indexes and average of the relative proportion of husk tomato volatiles collected with three methods.

Compuesto	Índices de retención de Kovats en dos columnas cromatográficas		Abundancia relativa (%) por método de extracción		
	HP-5ms	Supelcowax 10	AD	MEFS	Lavado
$\beta$ -pineno	997	1076	10.80	10.84	14.51
3-careno	1026	1143	1.62	1.12	0.82
Alcohol bencílico	1033	1376	1.95	1.95	0.99
$\beta$ -elemeno	1060	1267	0.09	0.09	0.05
Decanal	1199	1476	0.06	0.04	0.03
Salicilato de metilo	1222	1740	47.40	47.56	15.74
$\beta$ -cariofileno	1436	1587	38.03	38.18	34.66
Germacreno D	1473	1598	0.03	0.18	0.57
No identificado	-	-	-	-	4.21
Acido hexadecanoico	1976	2856	-	-	4.21
Linolenato de metilo	2125	2508	-	-	2.20
Linolenato de etilo	2215	2621	-	-	18.95
No identificado	-	-	-	-	3.02

n = 4.

también por AD y MEFS. Además se detectaron ácido hexadecanoico y linolenato de metilo, los cuales no fueron detectados en los extractos obtenidos por los otros métodos (Cuadro 1).

La liberación de  $\beta$ -cariofileno y germacreno D (Cuadro 1) aumentó en los extractos obtenidos por lavado con hexano, donde se cortó la raíz y se manipuló sólo la parte aérea de la planta. Buttery *et al.* (1987) trabajaron con *Lycopersicon esculentum* y observaron que en las hojas intactas la concentración de (Z)-3-hexanal y (E)-2-hexanal fue relativamente baja. Sin embargo, en hojas cortadas la concentración de estos aldehídos se incrementó drásticamente. En un estudio con plantas de papa (*Solanum tuberosum*), las hojas intactas liberaron pequeñas cantidades de  $\beta$ -cariofileno y cuando se realizaron pequeños cortes en las hojas, la liberación de  $\beta$ -cariofileno aumentó y además liberaron germacreno D (Angelopolus *et al.*, 1999).

En los extractos obtenidos por lavado con hexano se encontró ácido hexadecanoico, linolenato de metilo y linolenato de etilo, no detectados en los extractos obtenidos con AD y MEFS donde la planta se manejó completa, sin cortar la raíz. Este fenómeno se observó en un estudio con plantas de tomate (*L. esculentum*) con heridas, donde se registró un mayor número de compuestos volátiles en comparación con plantas sin heridas (Thaler *et al.*, 2002).

Ocho de los volátiles de plantas de tomate de cáscara se han encontrado en nueve especies de otras solanáceas. El salicilato de metilo está en *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987), *Capsicum annum* (Baur *et al.*, 1996), *Datura wrightii* (Fraser *et al.*, 2003), *Nicotiana silvestris*, *N. suaveolens* (Loughrin *et al.*, 1992) y *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002). El alcohol bencílico está en *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987), *C. annum* (Baur *et al.*, 1996) *Datura wrightii* (Fraser *et al.*, 2003), *N. silvestris*, y *N. suaveolens* (Loughrin *et al.*, 1992). El decanal está en *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987), *C. annum* (Baur *et al.*, 1996) y *D. wrightii* (Fraser *et al.*, 2003). El  $\beta$ -pineno está en *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987), *S. stuckertii* y *S. incisum* (Zygodlo y Grosso, 1997). El  $\beta$ -cariofileno está en *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987) y *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002). El germacreno D está en *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002) y *S. stuckertii* (Zygodlo y Grosso, 1997). El ácido hexadecanoico está en *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987) y *C. annum* (Baur *et al.*, 1996); y el  $\beta$ -elemeno en *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002).

*stuckertii* (Zygodlo and Grosso, 1997). Hexadecanoic acid is in *S. tuberosum* (Dickens, 2000), *L. esculentum* (Buttery *et al.*, 1987) and *C. annum* (Baur *et al.*, 1996); and  $\beta$ -elemene is found in *N. tabacum* (Mozuraitis *et al.*, 2002).

*L. esculentum*, *S. tuberosum* and *N. tabacum* are the species of solanaceas that share the most volatiles (six, five and four) with *P. philadelphica*. Only three compounds identified in husk tomato are found in plants that are not solanaceas: 3-carene in *Juniperus cedros* (Pino *et al.*, 2003) and *Pinus sylvestris* (Tammela *et al.*, 2003); ethyl linolenate in *Morus nigra* (Elmaci and Altug, 2002) and *Valeriana pseudofficinalis* (Gu *et al.*, 1999), and methyl linolenate in *Archis hypogea* (Rao *et al.*, 1988).

## CONCLUSIONS

Thirteen volatile compounds were isolated from husk tomato plants and 11 were identified. Using DA and SPME as methods of extraction, the volatiles methyl salicylate,  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -pinene, 3-carene, benzyl alcohol,  $\beta$ -elemene, decanal and germacrene D were identified.

With the hexane washing method, the same compounds were isolated as with DA and SPME, as well as ethyl linolenate, hexadecanoic acid and methyl linolenate and two unidentified compounds.

Of the 11 compounds identified in *P. philadelphica*, eight are reported to be found in other solanaceas, and five are found in *L. esculentum* plants.

—End of the English version—



*L. esculentum*, *S. tuberosum* y *N. tabacum* son las especies de solanáceas que comparten más volátiles (seis, cinco y cuatro) con *P. philadelphica*. Sólo tres compuestos identificados en el tomate de cáscara se encuentran en plantas que no pertenecen a las solanáceas: 3-careno en *Juniperus cedros* (Pino *et al.*, 2003); y *Pinus sylvestris* (Tammela *et al.*, 2003); linolenato de etilo en *Morus nigra* (Elmaci y Altug, 2002) y *Valeriana pseudofficinalis* (Gu *et al.*, 1999); y linolenato de metilo en *Arachis hypogea* (Rao *et al.*, 1988).

## CONCLUSIONES

Se aislaron 13 compuestos volátiles de plantas de tomate de cáscara y 11 se identificaron. Usando AD y MEFS como métodos de extracción se identificaron los volátiles salicilato de metilo,  $\beta$ -cariofileno,



$\beta$ -pineno, 3-careno, alcohol bencílico,  $\beta$ -elemeno, decanal y germecreno D.

Con el método de lavado con hexano se aislaron los mismos compuestos que con AD y MEFS, además del linolenato de etilo, el ácido hexadecanoico y el linolenato de metilo, así como dos compuestos no identificados.

De los 11 compuestos identificados en *P. philadelphica*, ocho se reportan en otras solanáceas y cinco están en plantas de *L. esculentum*.

## LITERATURA CITADA

- Angelopoulos, N. G., A. M. Hooper, S. P. Maniar, J. A. Pickett, and L. J. Wadhams. 1999. A novel approach for isolation of volatile chemicals released by individual leaves of a plant in situ. *J. Chem. Ecol.* 25: 1411-1425.
- Bartle, K. D. 1993. Introduction to the theory of chromatographic separations with reference to gas chromatography. In: *Gas Chromatography. A Practical Approach*. Baugh, P. J. (ed). Oxford University Press Inc. New York. pp: 1-13.
- Baur, P., H. Marzouk, J. Schönherr, and H. Bauer. 1996. Mobilities of organic compounds in plant cuticles as affected by structure and molar volumes of chemicals and plant species. *Planta* 199: 404-412.
- Bautista, M., N., y O. Morales G. 2000. Insectos defoliadores y barrenadores de mayor importancia en hortalizas. In: *Temas Selectos en Fitosanidad y Producción de Hortalizas*. Bautista M., N., A. D. Suárez V., y O. Morales G. (eds). Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. pp: 1-2.
- Bernays, E. A., and R. F. Chapman. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York. 312 p.
- Bock, M. A., J. Sánchez P., L. J. McKee, and M. Ortiz. 1995. Selected nutritional and quality analyses of tomatillos (*Physalis ixocarpa*). *Plant Foods Hum. Nutr.* 48: 127-133.
- Brazzel, J. R., L. D. Newsome, T. S. Rousel, C. Lincoln, F. J. Williams, and G. Barnes. 1953. Bollworm and tobacco budworm as cotton pest in Louisiana and Arkansas. *La. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull.* 482: 47.
- Bukasov, S. M. 1963. Las Plantas Cultivadas en México, Guatemala y Colombia. Lima. IICA. Publicación Especial 20. 240 p.
- Buttery, R. G., L. C. Ling, and D. M. Light. 1987. Tomato leaf volatile aroma components. *J. Agric. Food Chem.* 35: 1039-1042.
- Calyecac-Cortero, H. G., J. Cibrián-Tovar, J. López-Collado y R. García-Velasco. 2006. Emisores de los volátiles de atracción de *Trichobaris championi* Barber. *Agrociencia* 40: 655-663.
- Dicke, M., T. A. Van Beek, M. A. Posthumus, N. Ben Dom, H. Van Bokhoven, and A. E. De Groot. 1990. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. Involvement of host plant in its production. *J. Chem. Ecol.* 16: 381-396.
- Dickens, J. C. 2000. Sexual maturation and temporal variation of neural responses in adult Colorado potato beetles to volatiles emitted by potato plants. *J. Chem. Ecol.* 26: 1265-1279.
- Elmaci, Y., and T. Altug. 2002. Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data. *J. Agric. Food Agric.* 82: 632-635.
- Fraser, A. M., W. L. Mechaber, and J. G. Hildebrand. 2003. Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *J. Chem. Ecol.* 29: 1813-1833.
- Fuentes Contreras, E., E. Gianoli, E. Quiroz, C. C. Ramírez y H. M. Niemeyer. 2001. Ecología de las relaciones entre áfidos y plantas. In: Anaya, A. L., F. Espinosa García, y R. Cruz-Ortega (coord). *Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. Instituto de Ecología, Plaza y Valdez Editores. México. pp: 305-375.
- Gu, C, S. Lu, and L. Gu. 1999. Abstraction of *Valeriana pseudofficinalis* flower essential oil and analysis by GC/MS. *Chem. Ind. For. Prod.* 19: 75-78.
- Hernández, R. F., y J. L. Carrillo S. 1973. Parasitismo natural de *Trichogramma* spp. sobre el gusano del fruto de *Physalis* sp. en el estado de Morelos. *Agric. Téc. Méx.* 3(7): 255-258.
- Loughrin, J. H., T. R. Hamilton-Kemp, H. R. Burton, R. A. Andersen, and D. F. Hildebrand. 1992. Glycosidically bound volatile components of *Nicotiana silvestris* and *N. suaveolens* flowers. *Phytochemistry* 31: 1537-1540.
- Millar, J. G., and K. F. Haynes. 1998. *Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods*. Vol. 1. Kluwer Academic Publisher. 389 p.
- Morton, J.F. 1987. Mexican husk tomato. In: *Fruits of Warm Climates*. Morton, J. F. (ed). Creative Resource Systems, Inc. Miami Florida. pp: 434-437.
- Mozuraitis, R., M. Strandén, M. I. Ramírez, A. K. Borg-Karlson, and H. Mustaparta. 2002. Germacrene D increases attraction and oviposition by the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*. *Chem. Senses* 27: 505-509.
- Pawliszyn, J. 1997. *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*. Wiley-VCH. New York. 247 p.
- Peña L., A., y F. Márquez S. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Rev. Chapingo*. Año XV, 71-72: 84-88.
- Penton, Z. E. 1996. Sample preparation for gas chromatography with solid-phase extraction and solid-phase microextraction. *Ad. Chromat.* 37: 205-236.
- Pérez M., L., y J. Granados A. 2001. Fertilización nitro-fosfórica en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) de riego en Irapuato, Guanajuato, México. *Acta Universitaria* 11: 19-25.
- Pino, J. A., P. Fernandes, G. Freitas, and R. Marbot. 2003. Chemical composition of the leaf oil of *Juniperus cedros* Webb. et Berth. From Madeira. *J. Essential Oil Res.* 15: 331-332.
- Rao, P. V. S., J. P. Geiger, J. Einhorn, C. Alosse, B. Rio, M. Nicole, S. Savry, and A. Ravise. 1988. Isolation of methyl linolenate, a new antifungal compound from *Arachis hypogaea* L. leaves infected with *Puccinia arachidis* Speg. *Oléagineux* 43: 173-176.
- Robards, K., P. R. Haddad, and P. E. Jackson. 1994. *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Academic Press. New York. 231 p.
- Schulz, H., H. Krüger, N. Herchert, and E. R. J. Keller. 2000. Occurrence of volatile secondary metabolites in selected *Allium* wild types. *J. Appl. Bot.* 74: 119-121.
- SIACON (Sistema de Información Agropecuaria y de Consulta). 2005. Información de la Producción Agrícola Nacional. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Disponible en línea en <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/sistemas/siacon/SIACON.html>. Consultado el 27 de agosto de 2006.
- Smith, P. M. 1976. *The Chemotaxonomy of Plants*. Elsevier, New York. 313 p.
- Stein, S., A. Levitsky, O. Fateev, D. Tchekhovskoi, and G. Mallard. 2000. NIST 98. Mass Spectral Search Program. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. USA.
- Stevens, I. D. R. 1998. Chemical aspects of pheromones, isolation and structure determination. In: *Insect Pheromones and their Use in Pest Management*. Howse, P. E., I. D. R. Stevens, and O. T. Jones (eds). Chapman and Hall, London. pp: 180-225.
- Tammela, P., M. Nygren, I. Laako, A. Hopia, H. Vuorela, and R. Hiltunen. 2003. Volatile compound analysis of ageing *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) seeds. *Flavour Frag. J.* 18: 290-295.

- Thaler, J. S., M. A. Farag, P. W. Paré, and M. Dicke. 2002. Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defense against herbivores. *Ecol. Letters* 5: 764-774.
- Tingle, F. C., E. R. Mitchell, and R. R. Heath. 1990. Preferences of mated *Heliothis virescens* and *H. subflexa* females for host and nonhost volatiles in a flight tunnel. *J. Chem. Ecol.* 16: 2889-2898.
- Weurman, C. 1969. Isolation and concentration of volatiles in food odor research. *J. Agr. Food Chem.* 17: 370-384.
- Zygadlo, J. A., and N. R. Grosso. 1997. Volatile constituents from the flowers of *Solanum stuckertii* and *S. incisum*. *J. Essential Oil Res.* 9: 111-113.